製品コード RR039A

研究用

TaKaRa

Premix Ex Taq™
(Perfect Real Time)

説明書

v201407Da

Premix Ex Taq（Perfect Real Time）は、検出に TaqMan®＊1 プローブを用いるリアルタイム PCR 用に開発された製品です＊2。2 × 濃度のプレミックスタイプ試薬で、反応液の調製が簡単です。抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート用酵素 *TaKaRa Ex Taq*® HS とリアルタイム PCR 用に最適化されたバッファーの組み合わせにより、非特異的増幅を抑制し、高い増幅効率、高い検出感度でリアルタイム PCR を行うことができます。高速 PCR に適しており、幅広いダイナミックレンジで正確なターゲットの定量、検出が行えますので、再現性よく信頼性の高いリアルタイム PCR 解析が可能です。

本製品の適応機種

- Thermal Cycler Dice® Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
- Thermal Cycler Dice Real Time *Lite*（製品コード TP700/TP760）
- Smart Cycler System/Smart Cycler II System（Cepheid 社）
- Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System（Life Technologies）
- LightCycler（Roche Diagnostics 社）
- Mx3000P（Agilent Technologies 社）など

＊1： TaqMan は、Roche Diagnostics 社の登録商標です。
The 5' nuclease process is covered by patents owned by Roche Molecular Systems, Inc. and F. Hoffmann-La Roche Ltd. Purchase of the product does not provide a license to use this patented technology.

＊2： SYBR® Green I での検出には、SYBR Green I をプレミックスした SYBR *Premix Ex Taq* (Tli RNaseH Plus)（製品コード RR420A）、SYBR *Premix Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus)（製品コード RR820A）をご使用ください。

I. 原理

本製品では、*TaKaRa Ex Taq* HS による PCR 増幅を行います。PCR 増幅産物は、TaqMan プローブによりリアルタイムでモニタリングします。

1. PCR

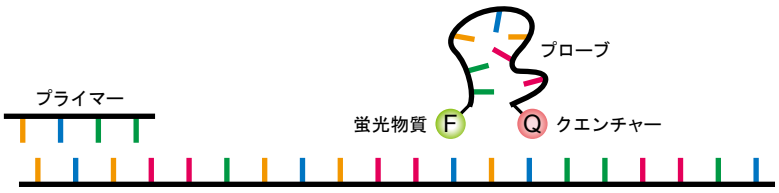
PCR 法は微量 DNA から目的の遺伝子断片のみを増幅させる技術です。DNA の熱変性、プライマーのアニーリング、DNA ポリメラーゼによる伸長反応の 3 ステップからなる工程を 1 サイクルとし、これを繰り返すことで、短時間のうちに目的遺伝子断片を 100 万倍にまで増幅させることが出来ます。
本製品では、増幅に Hot Start PCR 用酵素 *TaKaRa Ex Taq* HS を使用しているため、反応液調製時などサイクル前のミスプライミングやプライマーダイマーに由来する非特異的増幅を防ぐことができ、高感度の検出が可能になります。

2. 蛍光検出

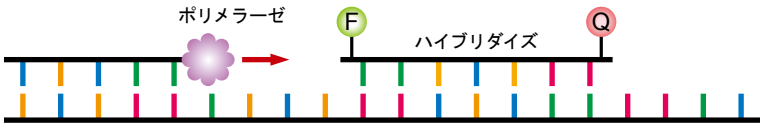
TaqMan プローブ法

5' 側を蛍光物質（FAM など）で、3' 側をクエンチャー物質（TAMRA など）で修飾したオリゴヌクレオチドを反応系に加えます。
アニール条件下では、TaqMan プローブはテンプレート DNA に特異的にハイブリダイズしますが、蛍光はクエンチャーによって抑制されています。伸長反応時、*Taq* DNA ポリメラーゼの持つ 5′ → 3′ exonuclease 活性により、テンプレートにハイブリダイズした TaqMan プローブが分解され、クエンチャーによる抑制が解除されることで発する蛍光を検出する方法です。

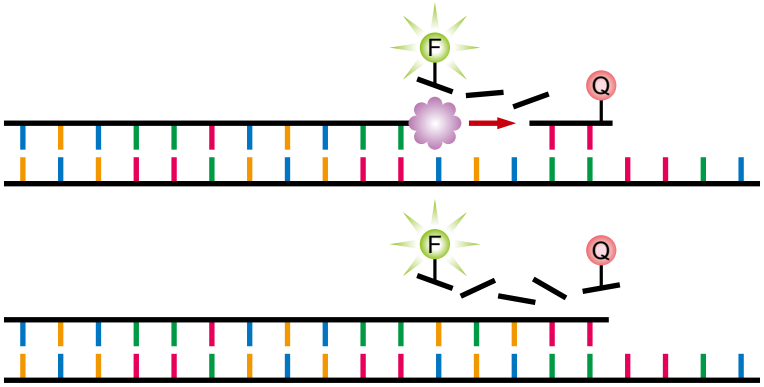
1）熱変性



2）プライマーのアニーリング／プローブのハイブリダイゼーション



3）伸長反応



II. 内容 [200 回（50 μl 反応分）]

Premix Ex Taq（Perfect Real Time）(2×conc.) ＊1	1 ml×5
ROX Reference Dye（50 × conc.）＊2	200 μl
ROX Reference Dye II（50×conc.）＊2	200 μl

＊1： *TaKaRa Ex Taq* HS、dNTP Mixture、Mg^{2+} を含む

＊2： Life Technologies のリアルタイム PCR 装置など、ウェル間の蛍光シグナルの補正を行う装置で解析する場合に使用します。

◆ ROX Reference Dye を添加する機種
- Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System（Life Technologies）

◆ ROX Reference Dye II を添加する機種
- Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System（Life Technologies）
- Mx3000P（Agilent Technologies 社）

◆ 添加の必要がない機種
- Thermal Cycler Dice Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
- Thermal Cycler Dice Real Time *Lite*（製品コード TP700/TP760）
- Smart Cycler System（Cepheid 社）
- LightCycler（Roche Diagnostics 社）

本製品以外に必要な試薬、機器（主なもの）

1. リアルタイム PCR 用遺伝子増幅システム（authorized instruments）
2. 専用反応チューブあるいはプレート
3. PCR 用プライマー
4. 検出用 TaqMan プローブ（licensed probe）
5. 滅菌蒸留水
6. マイクロピペットおよびチップ（オートクレーブ処理したもの）

III. 保存

4℃保存：6 ヶ月安定
※コンタミネーションには十分注意してください。

本製品はー 20℃輸送でお届けします。
長期保存の場合は、ー 20℃で保存してください。いったん融解したものは 4℃保存し、6 ヶ月を目途にご使用ください。

使用時には、穏やかな転倒混合により、必ず完全に溶解し、均一に混合してからご使用ください。

IV. 特長

1. リアルタイム PCR により、遺伝子の検出、定量を迅速かつ正確に行うことが可能です。
2. 2 × conc. のプレミックス試薬なのでピペッティング操作が簡便です。
3. PCR には、Hot Start 用酵素 *TaKaRa Ex Taq* HS を用いています。バッファー系はリアルタイム PCR 用に至適化されているため、増幅効率が良く、高感度な検出ができます。

V. 操作上の注意

本製品を使用する場合の注意事項です。使用前に必ずお読みください。

1. 使用時には、泡立てないよう穏やかに転倒混合し、試薬を均一にしてから使用してください。試薬が完全に混合されていない場合、十分な反応性が得られなくなります。ボルテックスによる混合は行わないでください。

   なお、*Premix Ex Taq*（2 × conc.）を− 20℃で凍結保存した場合、保存中に沈殿を生じることがあります。軽く手で暖めるか室温にしばらく置いた後、転倒混合することで完全に溶解します。必ず均一に混合してからご使用ください。

2. 融解した試薬はただちに氷上に置いてください。

3. 本製品は TaqMan プローブを含んでいません。別途、準備してください。

4. 反応液の調製、分注を行うときは必ず新しいディスポーザブルチップを用い、サンプル間のコンタミネーションを極力防止してください。

VI. 操作

＜ Thermal Cycler Dice Real Time System *II* および *Lite* を用いる場合の操作方法 ＞

※ Thermal Cycler Dice Real Time System の取扱説明書に従って操作してください。

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

＜ 1 反応あたり ＞

試薬	使用量	最終濃度
Premix Ex Taq（2 ×）	12.5 μl	1 ×
PCR Forward Primer（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM ＊1
PCR Reverse Primer（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM ＊1
TaqMan プローブ	1 μl	＊2
template	2 μl	＊3
dH_2O（滅菌蒸留水）	8.5 μl	
Total	25 μl	

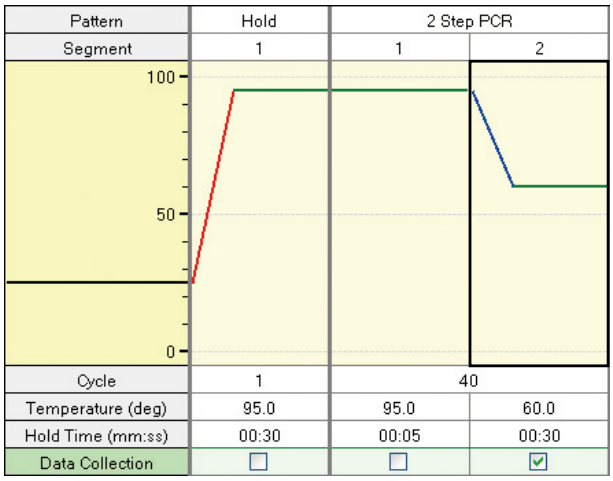
＊ 1： 最終プライマー濃度は 0.2 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.1 ～ 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

＊ 2： プローブ濃度は、使用するリアルタイム PCR 装置の機種やプローブの蛍光標識物質により異なる。装置の取扱説明書やプローブの添付データシートを参考に添加量を検討する。Thermal Cycler Dice Real Time System *II* および *Lite* の場合、通常、最終濃度 0.1 ～ 0.5 μM の範囲で検討する。

＊ 3： template 溶液中に存在するターゲットのコピー数により異なる。段階希釈して適当な添加量を検討する。DNA template 100 ng 以下を用いることが望ましい。また、RT-PCR で cDNA（RT 反応液）を template として添加する場合は、PCR 反応液容量の 10% 以下になるようにする。

2. 反応を開始する。

PCR 反応は、下記のシャトル PCR 標準プロトコールで行うことをお勧めします。アニーリング／伸長時間は 20 ～ 30 秒に設定できますが、より安定した結果が得られる 30 秒で、まずお試しください。（15 ページの「PCR 反応条件について」をご参照ください。）



シャトル PCR 標準プロトコール

Hold（初期変性）
Cycle：1
95℃　30 秒
2 Step PCR
Cycle：40
95℃　5 秒
60℃　30 秒

※ 使用上の注意

本製品に使用している *TaKaRa Ex Taq* HS はポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃（5 ～）15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。
PCR 反応前に鋳型の初期変性を行う場合でも、通常 95℃ 30 秒で充分です。

3. 反応終了後、増幅曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。

解析方法は、Thermal Cycler Dice Real Time System *II* および *Lite* の取扱説明書をご参照ください。

＜ Smart Cycler II System を用いる場合の操作方法 ＞

※ Smart Cycler System の取扱説明書に従って操作してください。

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

＜ 1 反応あたり ＞

試薬	使用量	最終濃度
Premix Ex Taq（2 ×）	12.5 μl	1 ×
PCR Forward Primer（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM ＊1
PCR Reverse Primer（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM ＊1
TaqMan プローブ	1 μl	＊2
template	2 μl	＊3
dH_2O（滅菌蒸留水）	8.5 μl	
Total	25 μl	

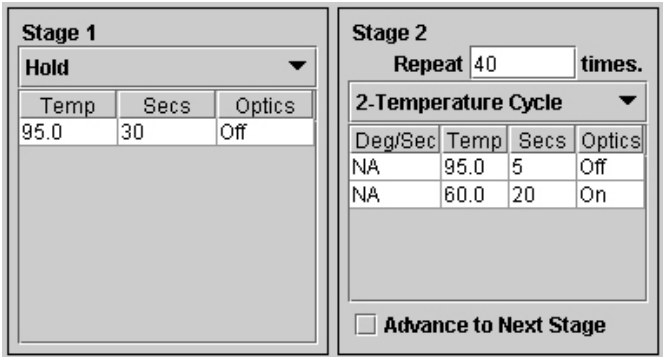
＊ 1： 最終プライマー濃度は 0.2 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.1 ～ 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

＊ 2： プローブ濃度は、使用するリアルタイム PCR 装置の機種やプローブの蛍光標識物質により異なる。装置の取扱説明書やプローブの添付データシートを参考に添加量を検討する。Smart Cycler System/Smart Cycler II System の場合、通常、最終濃度 0.1 ～ 0.5 μM の範囲で検討する。

＊ 3： template 溶液中に存在するターゲットのコピー数により異なる。段階希釈して適当な添加量を検討する。DNA template 100 ng 以下を用いることが望ましい。また、RT-PCR で cDNA（RT 反応液）を template として添加する場合は、PCR 反応液容量の 10% 以下になるようにする。

2. 反応チューブを Smart Cycler 用遠心機で軽く遠心後、Smart Cycler にセットし、反応を開始する。

   PCR 反応は、下記のシャトル PCR 標準プロトコールで行うことをお勧めします。まず、このプロトコールを試し、必要に応じて PCR 反応条件を至適化してください。
   （15 ページの「PCR 反応条件について」をご参照ください。）



シャトル PCR 標準プロトコール

Stage 1：初期変性
　Hold
　95℃　30 秒
Stage 2：PCR 反応
　Repeat：40 times
　95℃　 5 秒
　60℃　20 秒

※ 使用上の注意

本製品に使用している *TaKaRa Ex Taq* HS はポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃（5 〜）15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。
PCR 反応前に鋳型の初期変性を行う場合でも、通常 95℃ 30 秒で充分です。

3. 反応終了後、増幅曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。

   解析方法は、Smart Cycler System 取扱説明書をご参照ください。

＜ Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System を用いる場合の操作方法 ＞

※ 各装置の取扱説明書に従って操作してください。

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

＜ 1 反応あたり ＞

試薬	使用量	使用量	最終濃度
Premix Ex Taq（2 ×）	10 μl	25 μl	1 ×
PCR Forward Primer（10 μM）	0.4 μl	1 μl	0.2 μM ＊1
PCR Reverse Primer（10 μM）	0.4 μl	1 μl	0.2 μM ＊1
TaqMan プローブ	0.8 μl	2 μl	＊2
ROX Reference Dye or Dye II（50 ×）＊3	0.4 μl	1 μl	1 ×
template	2 μl	4 μl	＊4
dH_2O（滅菌蒸留水）	6 μl	16 μl	
Total	20 μl ＊5	50 μl ＊5	

＊ 1： 最終プライマー濃度は 0.2 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.1 ～ 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

＊ 2： プローブ濃度は、使用するリアルタイム PCR 装置の機種やプローブの蛍光標識物質により異なる。装置の取扱説明書やプローブの添付データシートを参考に添加量を検討する。

＊ 3： ROX Reference Dye II（50×）は、ROX Reference Dye（50×）より濃度が低く設定されています。7500 Real-Time PCR System および 7500 Fast Real-Time PCR System で解析する場合には、ROX Reference Dye II（50×）の使用を推奨します。7300 Real-Time PCR System には、ROX Reference Dye（50 ×）を使用してください。

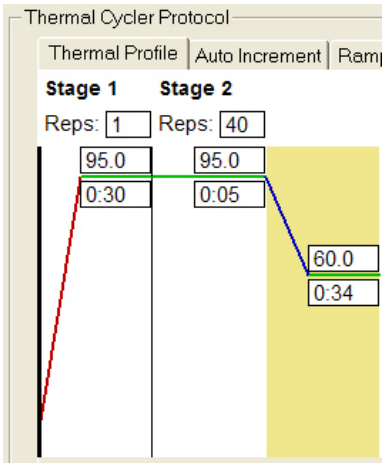
＊ 4： template 溶液中に存在するターゲットのコピー数により異なる。段階希釈して適当な添加量を検討する。20 μl あたり DNA template 100 ng 以下を用いることが望ましい。また、RT-PCR で cDNA（RT 反応液）を template として添加する場合は、PCR 反応液容量の 10%以下になるようにする。

＊ 5： 各装置の推奨容量に従って調製する。

2. 反応を開始する。

PCR 反応は、下記のシャトル PCR 標準プロトコールで行うことをお勧めします。まず、このプロトコールを試し、必要に応じて PCR 反応条件を至適化してください。
（15 ページの「PCR 反応条件について」をご参照ください。）

＜ Applied Biosystems 7300/7500 Real-Time PCR System ＞



シャトル PCR 標準プロトコール

Stage 1：初期変性
　Reps：1
　95℃　30 秒

Stage 2：PCR 反応
　Reps：40
　95℃　5 秒
　60℃　31 or 34 秒＊

＊：7300 では 31 秒に、7500 では 34 秒に設定する。

＜ Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System ＞

シャトル PCR 標準プロトコール

Holding Stage
　Reps：1
　95℃　30 秒

Cycling Stage
　Number of Cycles：40
　95℃　3 秒
　60℃　30 秒

※ 使用上の注意
本製品に使用している *TaKaRa Ex Taq* HS はポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃（5 〜）15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。
PCR 反応前に鋳型の初期変性を行う場合でも、通常 95℃ 30 秒で充分です。

3. 反応終了後、増幅曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。

解析方法は、各装置の取扱説明書をご参照ください。

＜ LightCycler を用いる場合の操作方法 ＞

※ LightCycler（Roche Diagnostics 社）の取扱説明書に従って操作してください。

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

＜ 1 反応あたり ＞

試薬	使用量	最終濃度
Premix Ex Taq（2 ×）	10 μl	1 ×
PCR Forward Primer（10 μM）	0.4 μl	0.2 μM ＊1
PCR Reverse Primer（10 μM）	0.4 μl	0.2 μM ＊1
TaqMan プローブ	0.8 μl	＊2
template	2 μl	＊3
dH_2O（滅菌蒸留水）	6.4 μl	
Total	20 μl	

＊ 1： 最終プライマー濃度は 0.2 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.1 ～ 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

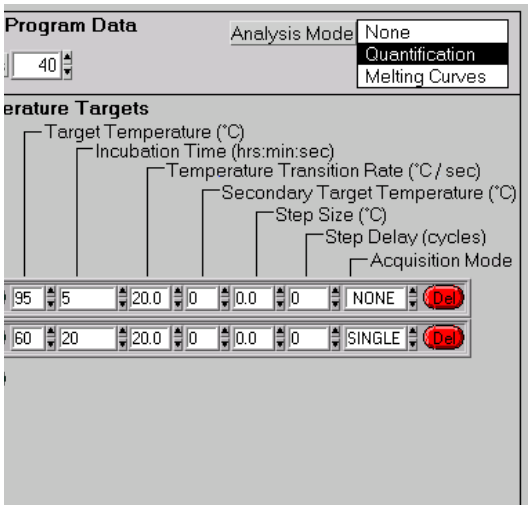
＊ 2： プローブ濃度は、使用するリアルタイム PCR 装置の機種やプローブの蛍光標識物質により異なる。装置の取扱説明書やプローブの添付データシートを参考に添加量を検討する。

＊ 3： template 溶液中に存在するターゲットのコピー数により異なる。段階希釈して適当な添加量を検討する。DNA template 100 ng 以下を用いることが望ましい。また、RT-PCR で cDNA（RT 反応液）を template として添加する場合は、PCR 反応液容量の 10% 以下になるようにする。

2. PCR キャピラリーを遠心機で軽く遠心後、LightCycler にセットし、反応を開始する。

PCR 反応は、下記のシャトル PCR 標準プロトコールで行うことをお勧めします。まず、このプロトコールを試し、必要に応じて PCR 反応条件を至適化してください。（15 ページの「PCR 反応条件について」をご参照ください。）

Stage 2：PCR 反応



シャトル PCR 標準プロトコール

Stage 1：初期変性
95℃　30 秒　20℃ / 秒
1 サイクル

Stage 2：PCR 反応
95℃　 5 秒　20℃ / 秒
60℃　20 秒　20℃ / 秒
40 サイクル

※ 使用上の注意
本製品に使用している *TaKaRa Ex Taq* HS はポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃（5 〜）15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。
PCR 反応前に鋳型の初期変性を行う場合でも、通常 95℃ 30 秒で充分です。

3. 反応終了後、増幅曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。

解析方法は、LightCycler の取扱説明書をご参照ください。

＜ Mx3000P を用いる場合の操作方法 ＞

※ Mx3000P（Agilent Technologies 社）の取扱説明書に従って操作してください。

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

＜ 1 反応あたり ＞

試薬	使用量	最終濃度
Premix Ex Taq（2 ×）	12.5 μl	1 ×
PCR Forward Primer（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM ＊1
PCR Reverse Primer（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM ＊1
TaqMan プローブ	1 μl	＊2
ROX Reference II（50 ×）＊3	0.5 μl	1 ×
template	2 μl	＊4
dH_2O（滅菌蒸留水）	8.0 μl	
Total	25 μl	

＊ 1： 最終プライマー濃度は 0.2 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.1 ～ 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

＊ 2： プローブ濃度は、使用するリアルタイム PCR 装置の機種やプローブの蛍光標識物質により異なる。装置の取扱い説明書やプローブの添付データシートを参考に添加量を検討する。

＊ 3： ウェル間の補正には、ROX Reference Dye II（50×）を使用する。
ROX Reference Dye（50 ×）は濃度を高く設定しているため、Mx3000P での使用には適さない。

＊ 4： template 溶液中に存在するターゲットのコピー数により異なる。段階希釈して適当な添加量を検討する。DNA template 100 ng 以下を用いることが望ましい。また、RT-PCR で cDNA（RT 反応液）を template として添加する場合は、PCR 反応液容量の 10% 以下になるようにする。

2. 反応を開始する。

PCR 反応は、下記のシャトル PCR 標準プロトコールで行うことをお勧めします。まず、このプロトコールを試し、必要に応じて PCR 反応条件を至適化してください。（15 ページの「PCR 反応条件について」をご参照ください。）

シャトル PCR 標準プロトコール

Segment 1：初期変性
95℃　30 秒
1 サイクル

Segment 2：PCR 反応
95℃　 5 秒
60℃　20 秒
40 サイクル

※ 使用上の注意

本製品に使用している *TaKaRa Ex Taq* HS はポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃（5 ～）15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。
PCR 反応前に鋳型の初期変性を行う場合でも、通常 95℃ 30 秒で充分です。

3. 反応終了後、増幅曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。

解析方法は、Mx3000P の取扱説明書をご参照ください。

＜ PCR 反応条件について ＞

初期変性

ステップ	温度	時間	検出	コメント
初期変性	95℃	30 秒	OFF	初期変性は通常 95℃ 30 秒で十分である。環状プラスミドやゲノム DNA など変性しにくい鋳型でもこの条件で良好に反応できることが多い。鋳型の状態によっては、95℃ 1 ～ 2 分程度に延長することが可能だが、時間が長すぎると酵素の失活を招く恐れがあるので、2 分以上の条件は推奨しない。

シャトル PCR（2 ステップ PCR）　サイクル数：30 ～ 45 サイクル

ステップ	温度	時間	検出	コメント
変性	95℃	3 ～ 5 秒	OFF	リアルタイム PCR の増幅サイズは一般的に 300 bp 以下なので、95℃で 3 ～ 5 秒程度でよい。
アニーリング／伸長	56 ～ 64℃	20 ～ 30 秒（31、34 秒）＊1	ON	まずは、60℃ 20 秒の条件を試す。反応条件の至適化を行う場合には、56 ～ 64℃の範囲で検討する。反応性が悪いときは、このステップの時間を延ばすと改善する場合がある。

＊ 1：Life Technologies の装置では、検出ステップを 30 秒以内に設定できない機種があります。

Applied Biosystems 7300 は 31 秒以上に、
Applied Biosystems 7500 は 34 秒以上に設定します。

VII. 備考；リアルタイム RT-PCR を行う場合

2 ステップ RT-PCR を行うには、PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time)（製品コード RR037A）との組み合わせが便利です。本キットの TaqMan プローブアッセイ用のプロトコールで逆転写反応を行ってください。

1. 下記に示す逆転写反応液を氷上で調製する。

（PrimeScript RT reagent Kit を使用）

＜ 1 反応あたり＞

試薬	使用量	最終濃度
5 × PrimeScript Buffer（for Real Time）	2 μl	1 ×
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5 μl	
Oligo dT Primer（50 μM）＊1	0.5 μl	25 pmol
Random 6 mers（100 μM）＊1	2 μl	200 pmol
total RNA		
RNase Free dH_2O		
Total	10 μl ＊2	

＊ 1： Oligo dT Primer と Random 6 mers の両方を用いると mRNA 全長にわたり効率よく cDNA が合成されます。なお、各プライマーを単独で用いる場合および Gene Specific Primer の場合の使用量は以下の通りです。

プライマー	使用量	添加量
Oligo dT Primer（50 μM）	0.5 μl	25 pmol
Random 6 mers（100 μM）	2 μl	200 pmol
Gene Specific Primer（2 μM）	0.5 μl	1 pmol

＊ 2： 逆転写反応は、必要に応じてスケールアップしてください。10 μl の反応液で逆転写出来るのは、およそ 1 μg までの total RNA です。

2. 逆転写反応を行う。

37℃　15 分 ＊3 （逆転写反応）
85℃　 5 秒　　（逆転写酵素を熱失活させる）
4℃

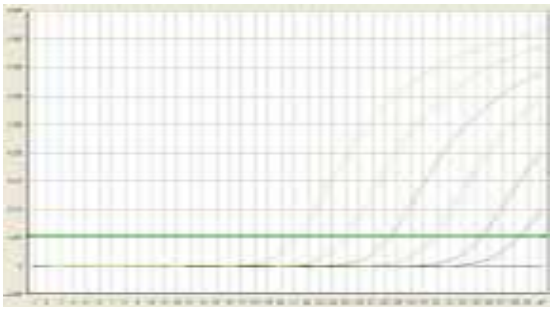
＊ 3： Gene Specific Primer を用いる場合：
逆転写反応を 42℃ 15 分で行ってください。PCR で非特異的な増幅が生じた場合には、逆転写温度を 50℃に変更すると改善される場合があります。

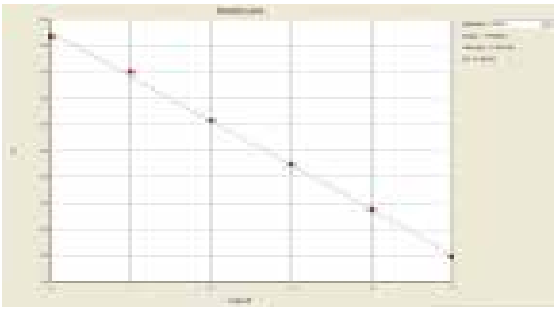
3. PCR 反応液を行う。

6 ページからの「VI. 操作」に記載されている方法に従って、PCR を行う。

■ 反応例（Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System を使用）

リアルタイム RT-PCR により Mouse Gapd mRNA の検出を行った。検出には、TaqMan Gene Expression Assays（Life Technologies）のプライマーと TaqMan プローブを用いた。total RNA 1 pg ～ 100 ng 相当量の cDNA 段階希釈液および Negative Control として dH_2O を鋳型とした。





VIII. 品質規格について

○ 品質検定

Smart Cycler System での λDNA を鋳型としたリアルタイム PCR 反応（増幅産物 300 bp）において、良好かつ安定した増幅を確認している。

TaKaRa Ex Taq HS について

○ 活性の定義

活性化サケ精子 DNA を鋳型／プライマーとして用い、下記の活性測定用反応液中にて 74℃において、30 分間に 10 nmol の全ヌクレオチドを酸不溶性沈殿物に取り込む活性を 1 U とする。

○ 活性測定用反応液組成

25 mM	TAPS 緩衝液（pH9.3、25℃）
50 mM	KCl
2 mM	$MgCl_2$
0.1 mM	DTT
各 200 μM	dATP・dGTP・dCTP
100 μM	[^{3}H]-dTTP
0.25 mg/ml	活性化サケ精子 DNA

○ 純度

1. 10 U の本酵素と 0.6 μg の λ-*Hin*d III 分解物とを 74℃ 1 時間反応させても DNA の電気泳動パターンに変化は起こらない。
2. 10 U の本酵素と 0.6 μg の supercoiled pBR322 DNA とを 74℃ 1 時間反応させても DNA の電気泳動パターンに変化は起こらない。
3. 10 U の本酵素と 0.6 μg の λDNA とを 74℃ 1 時間反応させても DNA の電気泳動パターンに変化は起こらない。

IX. 関連製品

Premix Ex Taq™ (Probe qPCR)（製品コード RR390A/B）
PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time)（製品コード RR037A/B）
PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)（製品コード RR047A/B）
PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time)（製品コード RR036A/B）
One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time)（製品コード RR064A/B）
SYBR® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus)（製品コード RR820S/A/B）
SYBR® *Premix Ex Taq*™ (Tli RNaseH Plus)（製品コード RR420S/A/B）
One Step SYBR® PrimeScript™ RT-PCR Kit II (Perfect Real Time)（製品コード RR086A/B）

Thermal Cycler Dice® Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
Thermal Cycler Dice® Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）
Smart Cycler II System（製品コード SC200N/SC210N）

X. 参考文献

1）吉崎美和 , 向井博之（2005）実験医学別冊 バイオ実験で失敗しない！「検出と定量のコツ」, 第 3 章 核酸の検出と定量のコツ 4. リアルタイム定量 PCR のコツ、120 - 126

2）吉崎美和 , 向井博之（2008）実験医学別冊 原理からよくわかる「リアルタイム PCR 実験ガイド」[3] 1）リアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現解析 , 39 - 43

XI. 注意

- 本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- *TaKaRa Ex Taq*、Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の、SYBR は Molecular Probes, Inc. の、TaqMan は Roche Diagnostics GmbH の登録商標です。*Premix Ex Taq*、PrimeScript はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-543-6116　Fax 077-543-1977
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

タカラバイオ株式会社

v201407Da